昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, October 2015, 58(10): 1072 - 1080 doi:10.16380/j. kcxb. 2015. 10. 005

中华蜜蜂 *mab*-21 基因序列分析及表达特征

薛　菲[1]，吴鹏杰[1,2]，李雨时[1,2]，王秀红[1]，国占宝[1]，徐书法[1,*]，吴　杰[1,*]

（1. 中国农业科学院蜜蜂研究所，农业部授粉昆虫生物学重点实验室，北京 100093；2. 福建农林大学蜂学学院，福州 350002）

摘要：【目的】探究中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Male abnomal 21(*mab*-21)基因在不同发育阶段的表达特性及染螨条件下 *mab*-21 基因表达变化规律。【方法】本研究利用 RT-PCR 方法,克隆了中华蜜蜂 *mab*-21 的基因编码区;采用荧光定量 PCR 方法检测了中华蜜蜂 *mab*-21 在不同发育时期(新出房蜂、哺育蜂、守卫蜂及采集蜂)工蜂头部中 mRNA 的表达量以及接种大蜂螨 *Varroa destructor* 前后 *mab*-21 基因的表达变化。【结果】克隆获得中华蜜蜂 *mab*-21 cDNA,命名为 *Accmab*21(GenBank 登录号 KR000001)。序列分析显示，该编码区开放阅读框长为 1 098 bp,编码 365 个氨基酸,推测的编码蛋白的相对分子量和等电点分别为 41.63 kD 和 8.53。系统发育分析表明中华蜜蜂 *mab*-21 与西方蜜蜂 *Apis mellifera mab*-21、小蜜蜂 *Apis florea mab*-21 和熊蜂 *Bombus impatiens mab*-21 聚成一支。该基因在中华蜜蜂工蜂的不同发育时期均有表达,其中哺育蜂阶段显著高于新出房蜂、守卫蜂和采集蜂($P<0.05$)。接种大蜂螨后,哺育蜂和守卫蜂中 *mab*-21 基因的表达下降显著($P<0.05$);而在新出房蜂和采集蜂中表达量变化不显著。【结论】该基因可能与中华蜜蜂抗螨行为相关。

关键词：中华蜜蜂；*mab*-21；基因克隆；序列分析；差异表达；抗螨性

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2015)10-1072-09

Sequence analysis and mRNA expression of *mab*-21 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

XUE Fei[1], WU Peng-Jie[1,2], LI Yu-Shi[1,2], WANG Xiu-Hong[1], GUO Zhan-Bao[1], XU Shu-Fa[1,*], WU Jie[1,*] (1. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】The aim of this study is to clone the full-length cDNA of *mab*-21 gene in the head of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, and then to analyze its expression characteristics in different developmental stages of the workers and after infection of mites, in attempt to provide a theoretical support for revealing the resistance mechanism of *A. cerana cerana* to Varroa mites.【Methods】The cDNA sequence of *mab*-21 in *A. cerana cerana* was cloned by RT-PCR, and a quantitative analysis of its expression level in the head of workers at different developmental stages (newly emerged bee, nurse, guarder and forager) and after infection of *Varroa destructor* mites was conducted using real-time PCR.【Results】The cDNA sequence of *mab*-21 was cloned from *A. cerana cerana*, and named as *Accmab*21 (GenBank accession no. KR000001). Its open reading frame (ORF) is 1 098 bp in length, encoding 395 amino acids with the predicted molecular weight of 41.63 kD and the theoretical isoelectric point of 8.53. Phylogenetic analysis indicated that *mab*-21 of *A. cerana cerana*, *A. mellifera*, *A. florea* and *Bombus impatiens* gather in the same clade. The *mab*-21 transcript was clearly detected in different developmental stages of the workers of *A. cerana cerana*, and was significantly higher in nurses than in other stages ($P<0.05$). After being inoculated with *V. destructor*, the expression of *mab*-21 in the nurses

基金项目：国家自然科学基金项目(31372384)；中国农业科学院科技创新工程专项经费(CAAS-ASTIP-2015-IAR)

作者简介：薛菲，女，1989 年生，河北邯郸人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂病理学，E-mail：xfnky123@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail：xushufa@caas.cn；apis@vip.sina.com

收稿日期 Received：2015-04-03；接受日期 Accepted：2015-05-04

and guarders significantly decreased as compared to the control ($P < 0.05$), but the expression level of *mab*-21 showed no obvious regularity in newly emerged bees and foragers. 【Conclusion】These results suggest that *mab*-21 may be involved in the resistance to mites in *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; *mab*-21; gene cloning; sequence analysis; differential expression; mite resistance

Male abnomal 21(*mab*-21)基因首先是在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中发现的,最初被认为是决定细胞命运的基因(Baird *et al*., 1991)。随后在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、斑马鱼 *Danio rerio*、爪蟾 *Xenopus laevis*、鸡 *Gallus gallus*、小鼠 *Mus musculus* 和人类 *Homo sapiens* 中陆续得到 *mab*-21 基因的同源基因 *Mab21l1* 和 *Mab21l2*(Mariani *et al*., 1998, 1999; Wong *et al*., 1999; Ho *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001; Wong and Chow, 2002b),研究表明,*mab*-21 基因在脊椎动物和无脊椎动物中均具有较高的保守性(Mariani *et al*., 1999; Wong and Chow, 2002b)。黑腹果蝇与线虫的 *mab*-21 基因核苷酸序列一致性为 50%,而与脊椎动物的序列一致性为 70%,而且黑腹果蝇和脊椎动物的 *mab*-21 基因都只有一个外显子(Lau *et al*., 2001),与脊柱动物亲缘关系更近。

结构功能研究上,*mab*-21 目前还没有与之对应的模体,相关分子功能的研究还不够深入。但研究发现,雄性线虫 *mab*-21 突变体能够阻止尾部感觉辐发育,能够造成第 6 条辐与第 4 条辐融合,能够引起运动不协调,因此,认为 *mab*-21 在线虫表皮和神经系统发育中起到重要作用(Chow *et al*., 1995)。进一步研究发现,*mab*-21 是位于 TGF-β 信号通路的下游靶基因,受 cet-1/sma 信号通路的负调控,并且 MAB21 作为转录抑制因子,参加负调节 BMP4 基因的表达,TGF-β 超家族成员通常作为多功能配体,控制多种细胞的增殖和分化(Kingsley, 1994; Morita *et al*., 1999; Baldessari *et al*., 2004)。Kim 等(2011)研究发现,JNK 通路通过对 MEF 磷酸化,可以增加 *mab*-21 的表达。在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中 JNK 通路参与调节免疫反应,可以帮助伤口复合(Richard *et al*., 2012)。有研究表明,果蝇中 MAB21 会与 Polycomb group(PcG)蛋白结合,进而对发育中同源异型基因的沉默转录位点产生影响(Nègre *et al*., 2006)。

狄斯瓦螨 *Varroa destructor*,又名大蜂螨,是一种寄生螨,主要危害西方蜜蜂,通过吸取蜜蜂幼虫和成虫的血淋巴,对蜜蜂的生理和身体造成伤害,目前狄斯瓦螨已经成为全球蜜蜂健康的最大威胁,对全世界养蜂业都造成了巨大的损失(Rosenkranz *et al*., 2010; Ji *et al*., 2014)。而中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 作为大蜂螨的原始寄主,同主要的经济蜂种西方蜜蜂相比,具有抗大蜂螨侵染、抗逆性强等优点。而且通过我们前期对染螨后中华蜜蜂转录组影响的研究发现,*mab*-21 是在中华蜜蜂染螨后转录组一系列差异表达基因中的一个,染螨后该基因表达量降低,与染螨前比较,表达量差异达极显著,推测 *mab*-21 与中华蜜蜂的抗螨性相关。2006 年西方蜜蜂基因组测序完成,通过生物信息学技术西方蜜蜂 *mab*-21 也被预测出来(The Honeybee Geome Sequencing Consortium, 2006)。我们根据西方蜜蜂 *mab*-21 基因序列,针对中华蜜蜂 *mab*-21 基因进行了克隆,对 *mab*-21 基因在中华蜜蜂不同发育阶段的表达特性进行了分析,并对中华蜜蜂接种大蜂螨后 *mab*-21 基因表达变化规律进行了荧光定量 PCR 分析,旨在为进一步研究中华蜜蜂抗螨的分子机理奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试蜜蜂

试验所用中华蜜蜂工蜂取自中国农业科学院蜜蜂研究所蜜蜂饲养场的中蜂蜂群,根据取样试验需要取不同年龄阶段的工蜂。其中羽化出房后 1－5 d 的工蜂为新出房蜂、出房后 6－14 d 的工蜂为哺育蜂、出房后 15－20 d 的工蜂为守卫蜂、21 d 以上的工蜂为采集蜂。

1.2　主要试剂与仪器

采用 Promega 公司的 RNA 反转录试剂盒(Promega 反转录试剂盒 A5000);总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent(Invitrogen 公司产品);大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5α、克隆载体 pMD19-T 及荧光定量 PCR 试剂盒 One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 *E. coli* 感受态细胞 Trans1-T1 购自全式金公司;2 × Taq PCR MasterMix, 6 × RNA/DNA loading buffer 等试剂购自博迈德公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自中科瑞泰生物科技有限公司。DYY-

6C 型电泳仪（北京六一科技有限公司产品），Mastercycler gradient 型 PCR 仪（Eppendorf 公司）产品，7500 Fast 荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems 公司产品）。

1.3 蜜蜂饲养及取样

选取 6 群群势相近的健康中华蜜蜂蜂群，每个蜂群 8 张足脾。本项研究中，中华蜜蜂清理行为检测根据 Bienefeld 等（1999）所描述。根据 Arechavaleta-Velasco 等（2012）的方法制作了一个蜂群观察箱（45 cm × 16 cm × 3 cm），在蜂箱一侧用钢丝网覆盖（16 cm × 10 cm）以便透气，剩余部分用透明塑料板，在塑料板中心处开一个直径约为 9 cm 的圆形天窗。准备若干直径为 9 cm 的圆柱形蜂笼，可插入圆形天窗中。实验过程中，将正常的单脾蜂群插入观察箱内。为保持蜂群平静，将蜂群置于黑暗环境，红灯下观察，以模仿自然蜂群环境。

大蜂螨接种方法参考 Dietemann 等（2013）的螨虫研究标准方法，用柔软的毛刷将大蜂螨接种到工蜂胸背板。蜂螨取自 3 群群势较弱、螨害严重的意大利蜜蜂蜂群。从 6 群中华蜜蜂蜂群中，分别取 4 个阶段工蜂（新出房蜂、哺育蜂、守卫蜂和采集蜂），各 100 头。一个阶段的工蜂以 5 头一组分组放至蜂笼中，分为 20 组（其中 10 组为未接螨组，10 组为接螨组）。未接螨组取样方法：先将一组蜜蜂用 CO_2 麻醉 2 min 至休克，然后用 5 种不同颜色（黄、绿、蓝、紫、橙）的荧光标记笔对 5 头蜜蜂进行标记，放入蜂笼中，将蜂笼插入事先准备好的实验观察箱中，约 7 min 后蜂笼中蜜蜂苏醒，进行观察并对其中绿色和橙色的 2 头蜜蜂取样，实验重复 10 次。接螨组取样方法与空白组取样方法相同，具体为：标记后对其中绿色和橙色的 2 头蜜蜂各接种 1 头大蜂螨，然后将蜂笼插入事先准备好的实验观察箱中，采用同样的方法观察，对具有清理行为的蜜蜂取样（实验中仅有 1 头表现为无清理行为，所以未进行统计），实验重复 10 次。取样后蜜蜂样品立即放入液氮中速冻，－80℃保存，用于提取总 RNA。

1.4 引物设计与合成

在 NCBI 中找出西方蜜蜂的 *mab*-21 基因（GenBank 登录号：XM_623072.4）的序列，利用 Primer Premier 5.0 软件，设计第 1 对特异性引物用于扩增中华蜜蜂 *mab*-21 基因的全长阅读框：mab-21-Forward：5′-GGTCCAACATCGTAAGAAGA-3′；mab-21-Reverse：5′-TGAATCAAGCATAACCCAC-3′。根据荧光定量引物设计原则，设计第 2 对引物用于荧光定量 PCR：M21-Forward：5′-CGGGGAGCGTGTGATGAC-3′；M21-Reverse：5′-CTCCTGCACCTCGACTTCC-3′。第 3 对引物用于内参基因 *β-actin* 的扩增：β-actin-Forward：5′-CGCTTCTGGACGTACTACTGG-3′；β-actin-Reverse：5′-CGAAGAATAGCATGAGGCAAAG-3′。上述引物在北京博迈德科技有限公司合成。

1.5 中华蜜蜂 *mab*-21 mRNA 序列的克隆

1.5.1 中华蜜蜂头部总 RNA 的提取：将各处理样本（随机取 2 头蜜蜂）置于冰上，用手术刀切取蜜蜂头部放入 1.5 mL EP 管中（约 100 mg 样本），加入液氮研磨。RNA 提取流程根据 Wang 等（2003）方法，略有修改。采用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop ND-2000 方法定量总 RNA 的纯度和浓度。实验重复 3 次。

1.5.2 第一链 cDNA 的合成：将各样品的总 RNA 稀释到 1 μg/μL，采用 Promega 反转录试剂盒，分别取 1 μL 样品进行反转录合成第一链 cDNA。将得到的第一链 cDNA 在 －20℃保存备用。

1.5.3 *mab*-21 的 RT-PCR 扩增：以头部 cDNA 为模板，使用第 1 对引物（分别为 mab-21-Forward 和 mab-21-Reverse），加入 2 × MasterMix 12.5 μL，ddH_2O 9.5 μL，正反向引物各 1 μL（10 μmol/L），cDNA 1 μL。反应条件为：94℃ 3 min；94℃ 30 s，57℃ 30 s，72℃ 90 s，共 35 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测。

1.5.4 PCR 产物的克隆与测序：使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒，将 PCR 产物回收纯化后，连接到 pMD19-T 载体上，然后转化入 Trans1-T1 大肠杆菌感受态细胞，接种到含 Ampicillin，X-Gal 和 IPTG 培养基中培养，挑取白色菌落，放入含有 50 μg/mL 氨苄的 LB 液体培养基中，震荡培养过夜。做菌液 PCR 验证，分别选取 10 个阳性克隆，送至博迈德公司测序。

1.6 序列分析

采用 Bioedit 软件对所得到的 DNA 序列进行翻译；利用 NCBI 的 BLAST 程序将中华蜜蜂和西方蜜蜂 *mab*-21 基因的 mRNA 序列进行比对；利用 NCBI 的 GenBank 数据库检索并下载已报道的 17 个物种的 MAB21 氨基酸序列；采用 NCBI 的 BLAST 程序比对中华蜜蜂与其他物种 MAB21 氨基酸序列的一致性；采用 ClustalX 软件将中华蜜蜂 *mab*-21 基因编码氨基酸序列与其他物种进行多重比对；应用 MEGA5.1 进行序列对比并建立系统发育树。

1.7 中华蜜蜂 *mab*-21 mRNA 相对表达量的测定

根据中华蜜蜂 *mab*-21 基因阅读框设计特异引物用于荧光定量 PCR 反应，同时本实验以 *β-actin* 为

内参基因。Real-time PCR 反应体系为 20 μL：2 μL cDNA 模板，10 μL SYBR Premix Ex Taq(2 ×)，正向和反向引物（分别为 M21-Forward 和 M21-Reverse）各 0.1 μL(10 μmol/L)，内标基因 *β-actin* 的上下游扩增引物各 0.1 μL，ROX Reference Dye(50 ×)0.4 μL，ddH$_2$O 7.4 μL。反应条件为：95℃ 30 s 预变性，95℃ 15 s，60℃ 34 s，40 个循环，每个循环后采集荧光生成扩增曲线和溶解曲线。每个样本每个基因设 3 个 PCR 平行反应。根据样品检测到的 Ct 值分析该基因在不同分工阶段和接螨前后的表达特性。

1.8　数据统计与分析

根据实验所得各样品目的基因和 *β-actin* 的 Ct 值，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法(Livak and Schmittgen, 2001)，以 *β-actin* 为阳性对照，对样品进行校正，分析中华蜜蜂 *mab*-21 在各发育阶段和接螨后的表达情况。不同样品之间的差异显著性分析采用 ANOVA 方法进行($P < 0.05$, LSD 多重比较)。

2　结果

2.1　中华蜜蜂 *mab*-21 基因的克隆

以中华蜜蜂头部 cDNA 为模板，用 mab-21-Forward 和 mab-21-Reverse 为引物进行扩增，电泳回收得到 1 700 ~ 2 000 bp 的片段，连接到 pMD19-T 载体，转化大肠杆菌 Transl-T1 感受态细胞，接种到含 Ampicillin，X-Gal 和 IPTG 培养基，筛选阳性重组子，菌液 PCR 进行鉴定，确定重组子中含有目的片段，然后进行测序，获得有效序列 1 715 bp。将测序结果在 NCBI 上进行同源性检索，结果表明其与西方蜜蜂 *mab*-21 序列最相似，一致性为 94%。该序列命名为 *Accmab*-21，并提交 GenBank 后获得登录号为 KR000001。

2.2　中华蜜蜂 *mab*-21 编码蛋白与其他物种的同源蛋白比较分析

对测序结果进行编码区分析，结果显示中华蜜蜂 *mab*-21 开放阅读框(ORF)全长为 1 098 bp(图 1)，编码 365 个氨基酸，预测分子量为 41.63 kD，等电点为 8.53。我们利用 NCBI 中 BLAST 将中华蜜蜂 *mab*-21 与已报道的其他物种的 *mab*-21 的氨基酸序列进行两两比较，结果见表 1。并运用 ClustalX 将中华蜜蜂 *mab*-21 与已报道的其他物种的 *mab*-21 基因的氨基酸序列进行多重序列比较，结果见图 2。

采用 MEGA5.1 软件中的邻位相连法(neighbor-joining, NJ)对这 18 个候选物种的 *mab*-21 氨基酸序列构建进化树(图 3)。进化树结果表明，中华蜜蜂 *mab*-21 与同为膜翅目的其他昆虫如西方蜜蜂、小蜜蜂 *Apis florea*、熊蜂 *Bombus impatiens* 及大蜜蜂 *Apis dorsata* 亲缘关系最近，处于同一个簇中；而双翅目的黑腹果蝇、地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*，同鳞翅目的家蚕处于另一个簇中；而且中华蜜蜂所属的昆虫纲，与脊椎动物中的人、小鼠、牛 *Bos taurus* 等，亲缘关系更近。

表 1　中华蜜蜂 *mab*-21 编码蛋白与其他物种的同源蛋白氨基酸序列一致性比较

Table 1　Amino acid sequence identity alignment of *mab*-21 from *Apis cerana cerana* and other species

同源蛋白来源物种 Origin species of homogeneous proteins	GenBank 登录号 GenBank accession no.	氨基酸序列一致性(%) Amino acid sequence identity
西方蜜蜂 *Apis mellifera*	XP_623075.1	100
小蜜蜂 *Apis florea*	XP_003693878.1	100
熊蜂 *Bombus impatiens*	XP_003491303.1	99
大蜜蜂 *Apis dorsata*	XP_006613153.1	94
黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	NP_651971.2	88
地中海实蝇 *Ceratitis capitata*	XP_04524884.1	87
埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	XP_001653106.1	87
冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*	XP_560259.3	86
赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	XP_966772.1	93
家蚕 *Bombyx mori*	XP_004923820.1	85
人 *Homo sapiens*	NP_006430.1	77
小鼠 *Mus musculus*	NP_035969.2	77
牛 *Bos taurus*	XP_002694365.1	77
鸡 *Gallus gallus*	NP_989521.2	77
非洲爪蛙 *Xenopus laevis*	NP_001090239.1	77
斑马鱼 *Danio rerio*	NP_694507.1	76
秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*	NP_497940.2	59

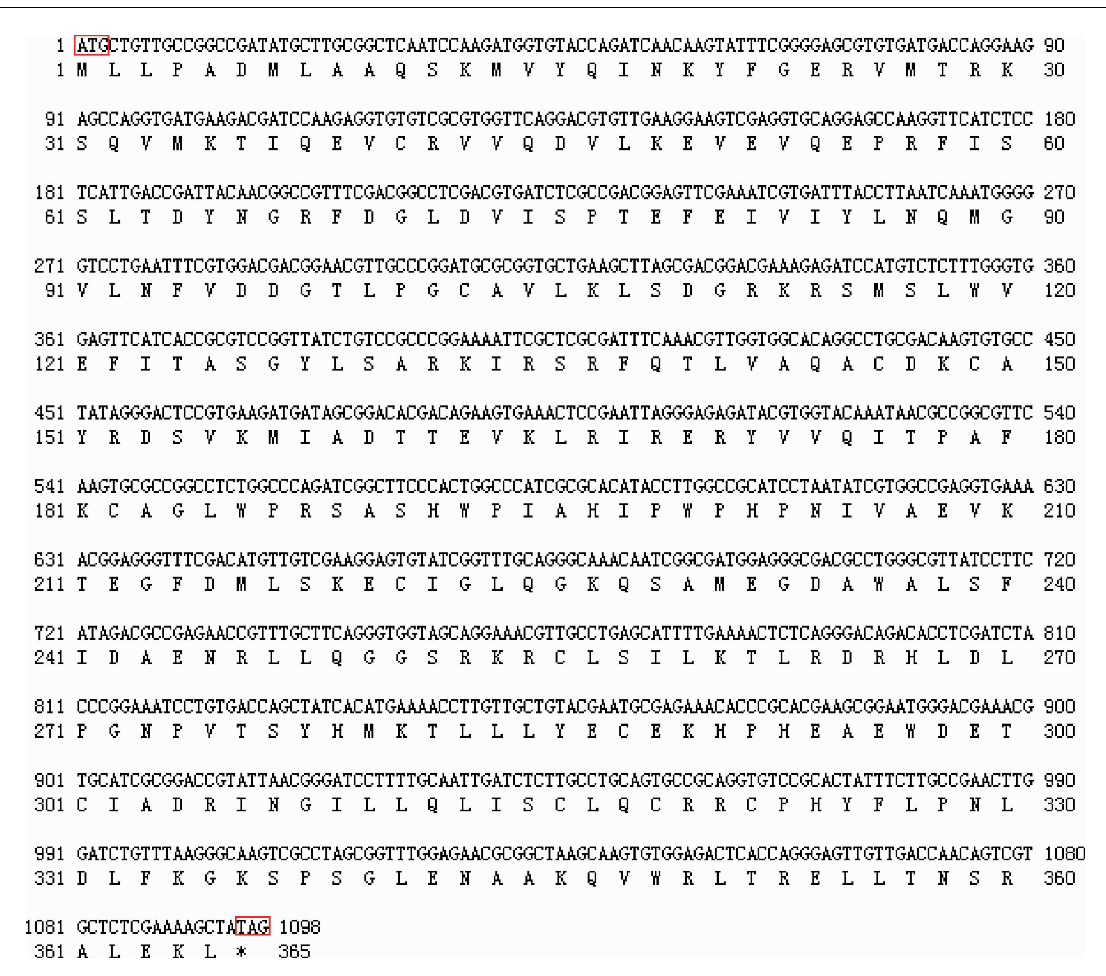


图 1 中华蜜蜂 *mab*-21 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *mab*-21 from *Apis cerana cerana*

方框所示为起始密码子和终止密码子。The initiation codon and terminate codon are boxed.

2.3 中华蜜蜂 *mab*-21 mRNA 在不同发育阶段相对表达量分析

利用荧光定量 PCR 分析了中华蜜蜂 *mab*-21 在不同发育阶段(新出房蜂、哺育蜂、守卫蜂和采集蜂)工蜂的 mRNA 表达差异和接螨后的表达量变化(图 4 和 5),通过对目的基因和内参基因的 Ct 值进行计算,得到 $2^{-\Delta\Delta Ct}$值进行方差分析。结果显示:该基因在不同发育时期均在工蜂头部有表达,哺育蜂表达量显著高于新出房蜂、守卫蜂和采集蜂($P < 0.05$),新出房蜂表达量最低,并且守卫蜂和采集蜂表达量没有显著差异。各阶段的表达量由高到低为(图 4):哺育蜂(10.2434 ± 0.5442) > 采集蜂(5.0107 ± 0.3278) > 守卫蜂(4.6150 ± 0.3479) > 新出房蜂(1.0030 ± 0.0557)。

2.4 中华蜜蜂 *mab*-21 mRNA 在接螨后相对表达量变化

接种大蜂螨后,哺育蜂和守卫蜂中 *mab*-21 表达水平发生变化。在接种大蜂螨 7 min 后哺育蜂 *mab*-21

```
Apis cerana cerana        -------------------------MLLPADMLAAQSKMVYQINKYFGERVMTRKSQVMKTIQEVCRVVQ 45
Apis mellifera            ...................................................................... 45
Apis florea               ...................................................................... 45
Apis dorsata              MRPESVPGNSPPGIFTVIGTGYRDN....Q..M......L..M...Y....QA.MG..Q...R...K... 70
Bombus impatiens          .................................S.................................... 45
Drosophila melanogaster   ...........................V.S..I.........M...CAD..QV..A.IH.Q......I.. 45
Ceratitis capitata        ...........................V.S..I.........M...CAD..QV..A.IH.Q.L....I.. 45
Aedes aegypti             ...........................V.PE.I.V...LI..M...CAD..QA..A.IH........... 45
Anopheles gambiae         ...........................V.PE.I.V...LI..M...CAD..Q...A.IH........... 45
Tribolium castaneum       ...........................V.P.........L......Y....Q..MGTIA...R...K... 45
Bombyx mori               ...........................V.PE.M.....L...M..FYN...AN..A.IT...H....I.. 45
Homo sapiens              .........................------.I...A.L...L...YT..CQA..AAIA...R...K..S 39
Mus musculus              .........................------.I...A.L...L...YT..CQA..AAIA...R...K..S 39
Bos taurus                .........................------.I...A.L..HL...YN.KCQA..AAIA...R...K..S 39
Gallus gallus             .........................------.I...A.L..HL...YN.KCQA..AAIA...R...K..S 39
Danio rerio               .........................------.I.T.A.L...L...YN..CQA..AAIA...R...K..S 39
Xenopus laevis            .........................------.I...A.L...L...YS..CQA..GAIA...R...K..S 39
Caenorhabditis elegans    .........................------..GHNQNV...V.N..N.K.QH..VR.T..V.RIAK... 39
```

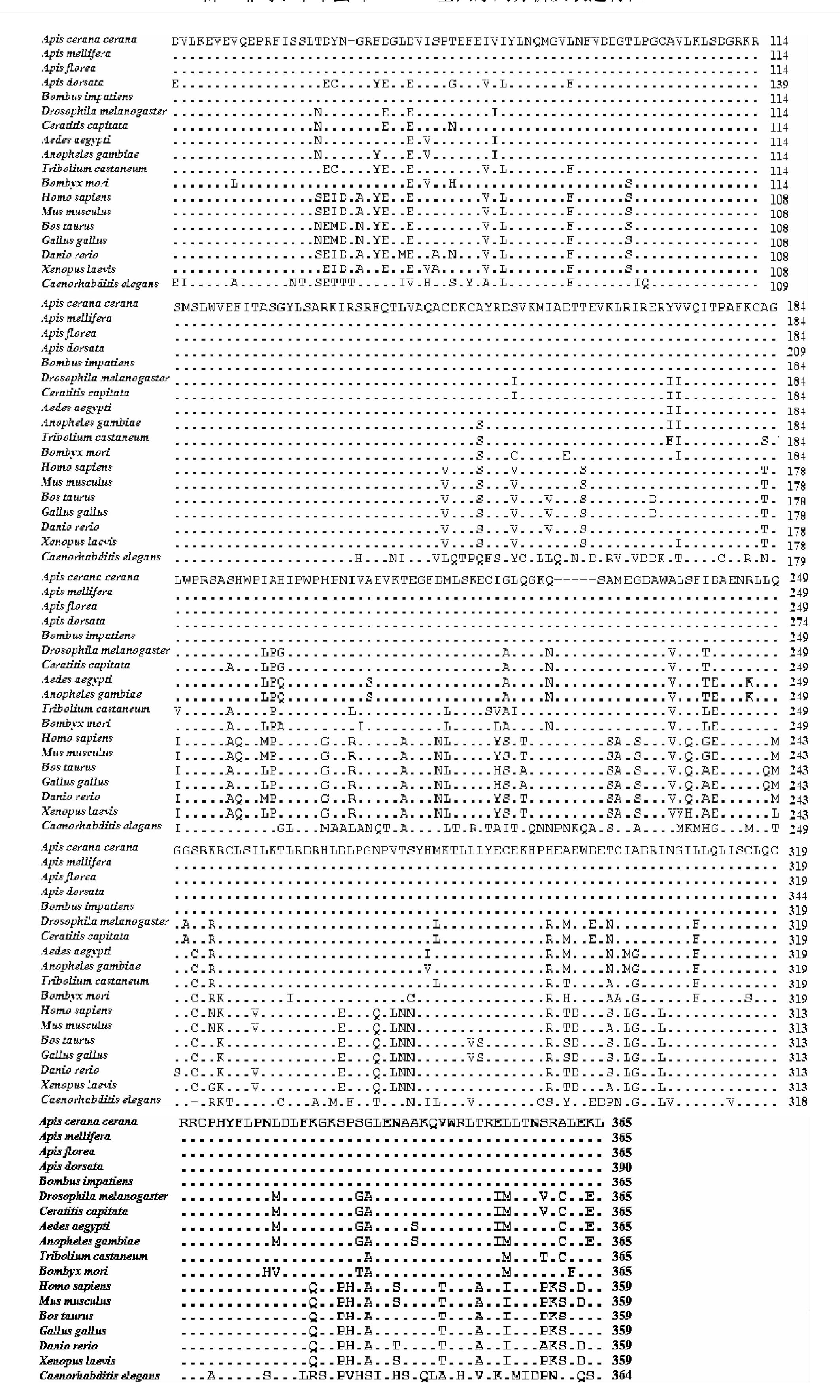


图 2　中华蜜蜂与其他物种 *mab*-21 氨基酸序列的同源性比较

Fig. 2　Amino acid sequence alignment of *mab*-21 from *Apis cerana cerana* and other species

物种名称参见表 1。Species names refer to Table 1.

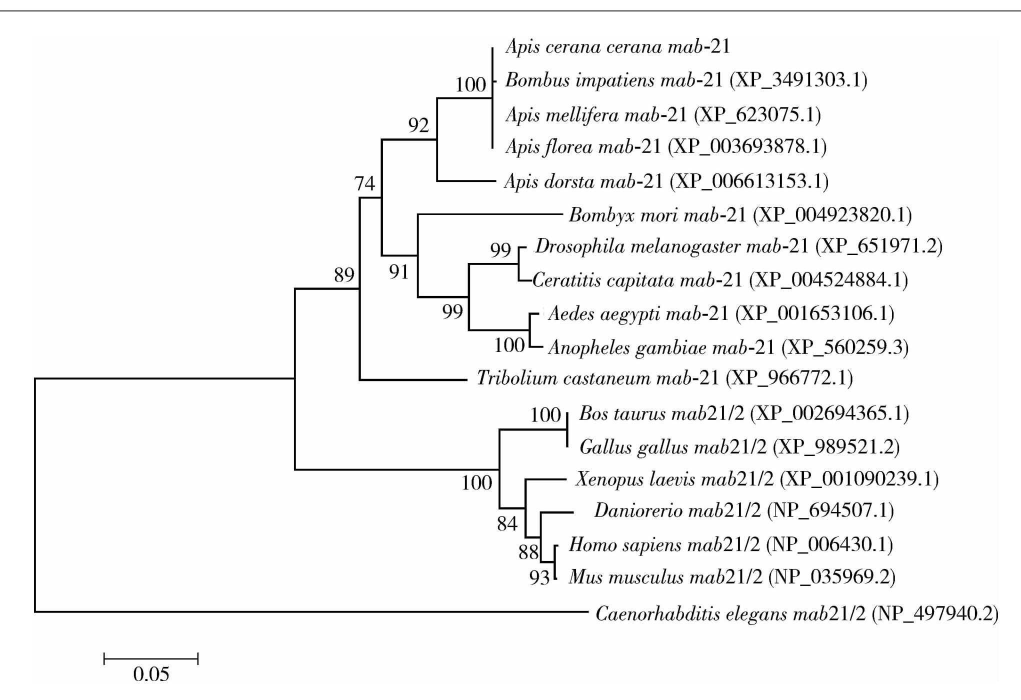


图 3 中华蜜蜂与其他物种 *mab*-21 氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of *mab*-21 from *Apis cerana cerana* and other species

系统发育树用邻位相连法进行了 2 400 次重复构建；以 0.05 的遗传距离作为标尺；物种名称参见表 1。Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining with 2 400 replications; the genetic distance of 0.05 is used as the scale bar; species names refer to Table 1.

表达急剧下降，表达量仅为对照的 25%；守卫蜂中的 *mab*-21 表达变化幅度较哺育蜂小，但依然呈明显下降趋势，表达量为对照的 50%；新出房蜂和采集蜂表达量变化较小，差异不显著(图 5)。

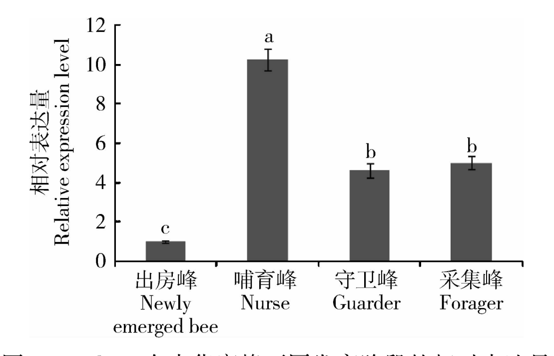


图 4 *mab*-21 在中华蜜蜂不同发育阶段的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of *mab*-21 in different developmental stages of *Apis cerana cerana*

图中数据(平均值 ± 标准差)是以新出房蜂的头部中表达量为基准；柱上不同字母表示不同发育阶段间基因表达存在显著差异($P < 0.05$)(LSD 多重比较)。Data (means ± *SD*) were normalized to the value in the head of the newly emerged bee, and those with different letters above bars are significantly different at the 0.05 level (LSD multiple comparison).

3 讨论

本研究首次获得中华蜜蜂 *mab*-21 基因序列，其基因 cDNA 序列全长为 1 098 bp，推测蛋白质序列为 365 个氨基酸，预测分子量为 41.63 kD，等电点为 8.53。氨基酸序列比对分析表明，中华蜜蜂 *mab*-21 与西方蜜蜂 *mab*-21、小蜜蜂 *mab*-21 的氨基酸序列相似性最高，一致性高达 100%，在进化地位上也最近；与鞘翅目的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* *mab*-21 序列一致性也高达 93%，而与鳞翅目和双翅目的昆虫的氨基酸序列则有多个氨基酸的不同，氨基酸水平上的一致性约在 85% ~88%；与其他物种间一致性也高达 50% 以上，这与所报道的 *mab*-21 基因在不同物种间具有较高的保守性相一致。*mab*-21 基因系统进化树结果表明，膜翅目昆虫聚成一支，聚类情况与物种分类一致。

蜂螨被认为是威胁全球蜂群健康的最主要因素之一，中华蜜蜂作为蜂螨的原始寄主，具有较强的清理能力，能够抵抗螨虫的侵害，其抗螨特性一直是研究的热点(Boecking and Spivak, 1999)。*mab*-21 已经在多种物种中被分离出来，并且通过遗传学和基因沉默实验发现并验证了 *mab*-21 在多种发育过程中起到重要的作用，包括原肠胚的形成、神经管的闭合、眼睛和晶体的形成(Chow *et al*., 1995; Lau *et al*., 2001; Wong and Chow, 2002a; Yamada *et al*., 2003)。前人研究 DANGER 蛋白时，发现包含 *mab*-21 部分区域，DANGER 作为一个膜相关蛋白，可以与

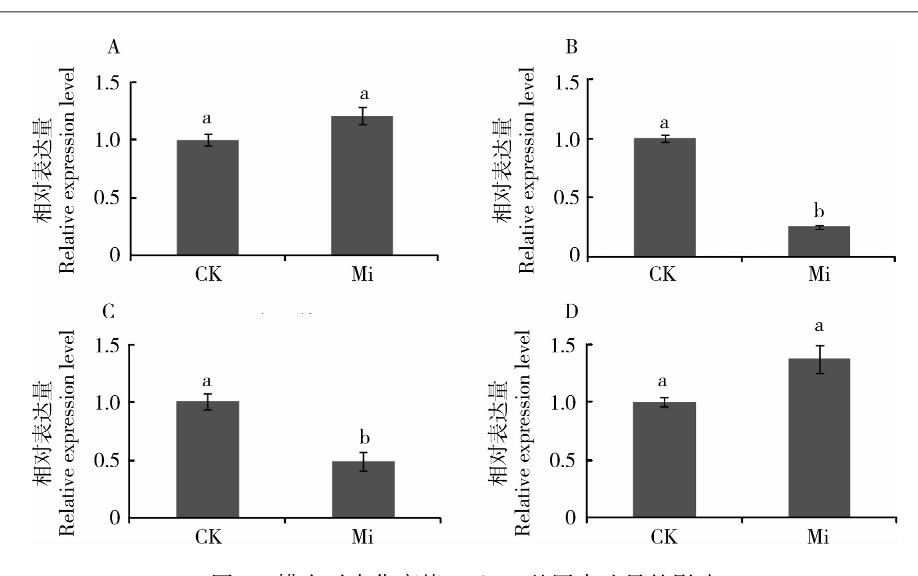


图 5　螨虫对中华蜜蜂 *mab*-21 基因表达量的影响

Fig. 5　Effects of mite infection on the expression level of *mab*-21 gene in *Apis cerana cerana*

A：新出房蜂 Newly emerged bee；B：哺育蜂 Nurse；C：守卫蜂 Guarder；D：采集蜂 Forager. CK：对照（未接种）Control（uninoculated）；Mi：接种螨虫 Mite infection. 图中数据（平均值 ± 标准差）是以未处理工蜂的头部含量为基准。柱上不同字母表示不同发育阶段间基因表达存在显著差异（$P<0.05$）（LSD 多重比较）。Data（means ± *SD*）were normalized to the value in the head of untreated workers, and those with different letters above bars are significantly different at the 0.05 level（LSD multiple comparison）.

与 IP_3R 结合，调控第二信使 Ca^{2+} 的释放，因此推测 MAB21 蛋白可能参与细胞内信号传导过程（Van Rossum *et al*., 2006）。同时研究发现，*mab*-21 是位于 TGF-β 信号通路和 JNK 信号通路的下游靶基因，TGF-β 信号通路和 JNK 信号通路在细胞增殖和伤口愈合方面都有重要作用，并且 *mab*-21 作为转录抑制因子可以对多种基因进行转录调控（Kingsley, 1994；Morita *et al*., 1999；Baldessari *et al*., 2004；Kim *et al*., 2011；Richardrt *et al*., 2012）。

我们的实验结果表明，*mab*-21 在中华蜜蜂的头部不同发育阶段均有表达，且差异显著。*mab*-21 在中华蜜蜂哺育蜂头部中的表达量显著高于在其他发育阶段的表达量。推测形成这种规律的原因是由于相对于守卫蜂和采集蜂，哺育蜂在蜂群中更多地从事巢内工作，其中重要的一项巢内工作就是负责清理巢内病敌害的侵入。许多研究表明，清理行为和卫生行为是中华蜜蜂抗螨的主要机制，尤其是清理行为能够显著减少蜂螨的群势增长（Arechavaleta-Velasco *et al*., 2012）。本实验研究中发现，接种螨虫后，各发育阶段的工蜂均会表现出一定强度的清理行为，但是哺育蜂的清理行为更加有效。前人的研究发现，蜂螨对不同劳动分工的蜜蜂有不同的喜好，其中蜂螨对哺育蜂的喜好超过其他分工的工蜂（Eliash *et al*., 2014）。而本实验的结果则表明哺育蜂似乎并不喜欢蜂螨，因为这个阶段的工蜂表现出较强的巢内清理行为，是中蜂抗螨的重要力量。本实验的结果表明，在中蜂接螨后，*mab*-21 基因在哺育蜂阶段的表达量显著低于相应对照组未接螨的基因表达量，而在其他年龄阶段从事着守卫、采集行为的工蜂及新出房的工蜂，在接螨前后该基因的表达同对照组未接螨的基因相比，虽然表达量有所变化，但差异不显著。从这一点来说，中华蜜蜂抗螨行为可能主要是由内勤蜂承担的，而在蜂群中，内勤蜂主要是哺育蜂，虽然守卫蜂也可能在巢内工作，但是其巢内工作的效果远不及哺育蜂，这也与前人在对非洲化蜜蜂（Africanized honey bee）的清理行为的研究结果相一致（Calderon *et al*., 2010），本研究结果同时也表明，*mab*-21 基因作为一个公认的转录抑制因子，其表达变化可能会引起哺育蜂清理行为的显著变化。由此可以说明 *mab*-21 基因可能是参与中华蜜蜂清理行为的一个基因。

目前为止，我们对 *mab*-21 基因功能的研究尚待进一步深入，尤其是对中华蜜蜂 *mab*-21 基因的上下游基因还不清楚，对其在中华蜜蜂抗螨事件中的功能并未真正得到验证，所以今后应采用 RNA 干扰方法等对 *mab*-21 在中华蜜蜂抗螨过程中的基因表达调控开展研究。

参考文献（References）

Arechavaleta-Velasco ME, Alcala-Escamilla K, Robles-Rios C, Tsuruda

JM, Hunt GJ, 2012. Fine-scale linkage mapping reveals a small set of candidate genes influencing honey bee grooming behavior in response to Varroa mites. *PLoS ONE*, 7(11): e47269.

Baird SE, Fitch DHA, Kassem IAA, Emmons SW, 1991. Pattern formation in the nematode epidermis: determination of the arrangement of peripheral sense organs in the *C. elegans* male tail. *Development*, 113(2): 515 – 526.

Baldessari D, Badaloni A, Longhi R, Zappavigna V, Consalez GG, 2004. MAB21L2, a vertebrate member of the male-abnormal 21 family, modulates BMP signaling and interacts with SMAD1. *BMC Cell Biol.*, 5(1): 48.

Bienefeld K, Zautke F, Pronin D, Mazedd A, 1999. Recording the proportion of damaged *Varroa jacobsoni* in the debris of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 30(4): 249 – 256.

Boecking O, Spivak M, 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2 – 3): 141 – 158.

Calderon RA, van Veen JW, Sommeijer MJ, Sanchez LA, 2010. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.*, 50(4): 281 – 297.

Chow KL, Hall DH, Emmons SW, 1995. The *mab*-21 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a novel protein required for choice of alternate cell fates. *Development*, 121(11): 3615 – 3626.

Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Frey E, Ziegelmann B, Rosenkranz P, Ellis JD, 2013. Standard methods for varroa research. *J. Apic. Res.*, 52: 1 – 54.

Eliash N, Singh NK, Kamer Y, Pinnelli GR, Plettner E, Soroker V, 2014. Can we disrupt the sensing of honey bees by the bee parasite *Varroa destructor*? *PLoS ONE*, 9(9): e106889.

Ho SH, So GMK, Chow KL, 2001. Postembryonic expression of *Caenorhabditis elegans mab*-21 and its requirement in sensory ray differentiation. *Dev. Dyn.*, 221(4): 422 – 430.

Ji T, Yin L, Liu Z, Liang Q, Luo Y, Shen J, Shen F, 2014. Transcriptional responses in eastern honeybees (*Apis cerana*) infected with mites, *Varroa destructor*. *Genet. Mol. Res.*, 13(4): 8888 – 8900.

Kim BG, Park YJ, Libermann TA, Cho JY, 2011. PTH regulates myleoid ELF-1-like factor (MEF)-induced MAB-21-like-1 (MAB 21L1) expression through the JNK1 pathway. *J. Cell. Biochem.*, 112(8): 2051 – 2061.

Kingsley DM, 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes. Dev.*, 8(2): 133 – 146.

Lau GTC, Wong OG, Chan PMY, Kok KH, Wong RYL, Chin KT, Lin MC, Kung HF, Chow KL, 2001. Embryonic *XMab-21l2* expression is required for gastrulation and subsequent neural development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280(5): 1378 – 1384.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Mariani M, Baldessari D, Francisconi S, Viggiano L, Rocchi M, Zappavigna V, Malgaretti N, Consalez GG, 1999. Two murine and human homologs of *mab*-21, a cell fate determination gene involved in *Caenorhabditis elegans* neural development. *Hum. Mol. Genet.*, 8(13): 2397 – 2406.

Mariani M, Corradi A, Baldessari D, Malgaretti N, Pozzoli O, Fesce R, Martinez S, Boncinelli E, Consalez GG, 1998. *Mab*-21, the mouse homolog of a *C. elegans* cell-fate specification gene, participates in cerebellar, midbrain and eye development. *Mech. Dev.*, 79(1 – 2): 131 – 135.

Morita K, Chow KL, Ueno N, 1999. Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of the TGF-β pathway. *Development*, 126(6): 1337 – 1347.

Nègre N, Hennetin J, Sun LV, Lavrov S, Bellis M, White KP, Cavalli G, 2006. Chromosomal distribution of PcG proteins during *Drosophila* development. *PLoS Biol.*, 4(6): e170.

Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM, 2012. Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 13: 558.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invert. Pathol.*, 103(Suppl. 1): S96 – S119.

The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114): 931 – 949.

Van Rossum DB, Patterson RL, Cheung KH, Barrow RK, Syrovatkina V, Gessell GS, Burkholder SG, Watkins DN, Foskett JK, Snyder SH, 2006. DANGER, a novel regulatory protein of inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor activity. *J. Biol. Chem.*, 281(48): 37111 – 37116.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003. Cloning expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 33(1): 115 – 124.

Wong RLY, Chan KKL, Chow KL, 1999. Developmental expression of *Mab-21l2* during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.*, 87: 185 – 188.

Wong RLY, Chow KL, 2002a. Depletion of *Mab-21l1* and *Mab-21l2* messages in mouse embryo arrests axial turning, and impairs notochord and neural tube differentiation. *Teratology*, 65(2): 70 – 77.

Wong YM, Chow KL, 2002b. Expression of zebrafish *mab*21 genes marks the differentiating eye, midbrain and neural tube. *Mech. Dev.*, 113(2): 149 – 152.

Yamada R, Mizutani-Koseki Y, Hasegawa T, Osumi N, Koseki H, Takahashi N, 2003. Cell-autonomous involvement of *Mab-21l1* is essential for lens placode development. *Development*, 130(9): 1759 – 1770.

（责任编辑：袁德成）